



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی کرمان  
دانشکده داروسازی و علوم دارویی

پایان نامه دکترای عمومی داروسازی

عنوان

بررسی سمیت عصبی نانوذرات زینک با استفاده از روش های رنگ سنجی و ترشح  
آنزیمی در سلول های PC12

توسط:

فائزه یوسف زاده کوهبنانی

اساتید راهنما:

دکتر حمیدرضا رحیمی

دکتر مجتبی شکیبائی

دکتر حمید فروتن فر



**Kerman University of Medical Sciences**

**Faculty of Pharmacy**

**Pharm. D Thesis**

**Title:**

**Investigation the neurotoxicity of zinc nanoparticles with colorimetric and enzyme release methods in PC12**

**By:**

**Faezeh Yousefzade-Koohbanani**

**Supervisors:**

**Dr. Hamid-Reza Rahimi**

**Dr. Mojtaba Shakibaie**

**Dr. Hamid Forootanfar**

**Summer 2019**

**Thesis No: 1111**

## چکیده

**مقدمه:** زینک یکی از املاحی است که خواص فیزیکوشیمیایی و بیولوژیکی خاصی دارد. اهمیت زینک در سلامتی انسان و حیوانات از سال‌ها پیش شناخته شده است. اما علی‌رغم فواید بسیار، دوزهای بالای زینک می‌تواند باعث به‌هم ریختن هموستاز سلولی و سمیت سلولی شود. امروزه به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد نانوذرات، تولید نانوذرات زینک برای مصارف مختلف دارویی و آرایشی افزایش یافته لذا با توجه به احتمال سمیت سلولی نانوذرات قبل از اضافه کردن آنها در فرمولاسیون دارو، بررسی سمیت این ترکیبات اهمیت دارد. در این مطالعه سمیت عصبی نانوذرات زینک علیه سلول‌های PC12 بررسی شد و مکانیسم آسیب آنها با استفاده از روش‌های رنگ سنجی فلوروسنت و ترشح آنزیمی مورد بررسی قرار گرفت.

**روش کار:** برای بیوسنتز نانوذرات روی از عصاره برگ گیاه *Lavandula vera* و امواج ماکروویو که قابلیت احیای یون‌ها را روی نانوذرات روی دارند، استفاده شد. بعد از اضافه کردن ZnO به عصاره برگ گیاه *Lavandula vera* و احیاء توسط امواج ماکروویو و به‌دست آمدن محلول تیره رنگی که شامل نانوذرات زینک می‌شود، آنها را سه بار شستشو دادیم. نانوذرات زینک تولید شده در تست MTT استفاده شد و  $IC_{50}$  نانوذرات زینک به عنوان کمترین غلظتی از نانوذرات که باعث مرگ ۵۰٪ سلول‌های PC12 می‌شود، محاسبه شد. سپس برای بدست آوردن مکانیسم سمیت عصبی از روش رنگ‌سنجی توسط رودامین ۱۲۳ و روش ترشح آنزیمی توسط آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH) بر طبق پروتکل استفاده گردید.

**نتایج:** نتایج نشان داد که نانوذرات روی سنتز شده کروی شکل بوده و اندازه ذره‌ای آنها در محدوده ۸۰ nm- قرار دارد. آنالیز نتایج تست سمیت سلولی نانوذرات نشان داد که در غلظت ۶۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر میزان سلول‌های زنده به ۵۰ درصد کاهش یافت و در روش ترشح آنزیمی با استفاده از LDH در غلظت‌های

۱۲۰، ۶۰، ۳۰ میکروگرم بر میلی لیتر با افزایش غلظت نانوذرات زینک، میزان ترشح آنزیم و در نتیجه آسیب سلولی افزایش یافت.

هم چنین در تست رنگ سنجی توسط رودامین ۱۲۳ در غلظت های ۶۰ و ۳۰ میکروگرم بر میلی لیتر با افزایش غلظت، میزان رنگ مشاهده شده و در نتیجه آسیب غشای سلولی و آزاد شدن میتوکندری هم افزایش یافته است. نتیجه گیری: نانوذرات زینک به صورت وابسته به غلظت و در غلظت بالا می تواند باعث به هم ریختگی یکپارچگی غشا و آسیب به میتوکندری شود، اما مطالعات بیشتری در مورد مکانیسم مرتبط با سمیت این نوع نانوذرات پیشنهاد می شود.

**کلمات کلیدی:** سمیت عصبی، زینک بیوژنیک، امواج ماکروویو، سمیت زیستی نانو.

## Abstract

**Introduction:** Zinc (Zn) is one of the trace elements with special physico chemical and biological properties. Its importance for human and animal health has been known for several years, but despite its various benefites, its high doses could cause to sever cellular homeostasis disorders and significant cellular toxicity. Today, due to the unique nature of nanoparticles, the production of zinc nanoparticles (Zn NPs) for various pharmaceutical, cosmetic significantly increased, but considering their safty and probable cellular toxicity before administration of this nano size compounds as pharmaceutic agent has great importance. In this study, neurotoxicity of Zn NPs against PC12 cells was evaluated and the mechanism of this injury was further studied using fleurcent staining and enzyme secretion assay.

**Methods:** For the biosynthesis of Zn NPs, leaf extract of *Lavandula vera* and irradiation microwave was used as reducing agent for production of Zn NPs. After mixing ZnO with *Lavandula vera* leaf extract, microwave treatment was performed and the obtained dark solution which contained Zn NPs was washed three times. The produced Zn NPs were further used for MTT assay study. The IC<sub>50</sub> value of Zn NPs was determined as the lowest concentration of nanoparticles which reduced growth of PC12 cells to lower than 50%. Also for investigating the

mechanism of toxicity induction, the fluorescent staining using Rhodamin 123 dye, and LDH enzyme assay were done according to standard protocols.

**Results:** The results showed that Zn NPs were spherical in shape and their particle size ranged from 30 to 80 nm. Analysis of the nanoparticles cellular cytotoxicity test showed that at a concentration of 62.5  $\mu\text{g/mL}$ , the cell viability was reduced to 50%. In the enzymatic secretion method using LDH, the enzyme secretion increased significantly in response to Zn NPs concentration (30, 60, 120  $\mu\text{g/mL}$ ). Also in the colorimetric tests using rhodamine 123 dye content, cellular membrane damage and mitochondrial release were increased in response to Zn NPs concentration (30 and 60  $\mu\text{g/mL}$ ).

**Conclusion:** Zinc nanoparticles exhibit cytotoxicity effect on neuronal cells by concentration-dependent manner and at their high concentrations can disrupt membrane integrity and mitochondrial damage, but further studies on the cytotoxicity mechanisms associated with these compounds are required.

**Keywords:** Neurotoxicity, Zinc Biogenic, Microwave, Mitochondria.



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی کرمان  
دانشکده داروسازی

پایان نامه خانم فائزه یوسف زاده کوه بنانی دانشجوی شهریه پرداز داروسازی ورودی ۹۲ به شماره : ۱۱۱۱  
تحت عنوان:

"بررسی سمیت عصبی نانوذرات زینک با استفاده از روشهای رنگ بنجی و ترشح آنزیمی در سلولهای عصبی رده PC-12"

اساتید راهنما:

۱- دکتر حمیدرضا رحیمی

۲- دکتر مجتبی شکیبایی

۳- دکتر حمید فروتن فر

هیئت محترم داوران به ترتیب حروف الفبا:

۱- دکتر آزاده امین راده

۲- دکتر بهزاد بهنام

۳- دکتر محمودرضا حیدری

در تاریخ ۹۸/۰۶/۳۱ مورد ارزیابی قرار گرفت و با نمره (با عدد) ۱۸/۹ .....  
(با حروف) هیئت داوران به تصویب رسید.

دکتر مصطفی پورنامداری  
رئیس اداره پایان نامه

دکتر محمودرضا حیدری  
رئیس دانشکده



